

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
21. Oktober 2004 (21.10.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2004/090123 A3**

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **C12N 9/02**,  
C12P 7/64, A01H 1/00, C12N 15/00, A01K 67/00, A23D  
9/00, A23K 1/16
- (21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP2004/003628**
- (22) Internationales Anmeldedatum:  
6. April 2004 (06.04.2004)
- (25) Einreichungssprache: **Deutsch**
- (26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**
- (30) Angaben zur Priorität:  
103 16 267.4 8. April 2003 (08.04.2003) **DE**
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): **BASF PLANT SCIENCE GMBH [DE/DE]; 67056  
Ludwigshafen (DE).**
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **CIRPUS, Petra  
[DE/DE]; Landteilst. 12, 68163 Mannheim (DE).  
BAUER, Jörg [DE/DE]; Friedrich-Profit-Str. 56, 67063  
Ludwigshafen (DE). MEYER, Astrid [DE/DE]; Jesseb-  
strasse 14, 22767 Hamburg (DE). HEINZ, Ernst [DE/DE];  
Püttkampsweg 13, 22609 Hamburg (DE). ZÄHRINGER,  
Ulrich [DE/DE]; Theodor-Storm-Str. 34A, 22926 Ahrens-  
burg (DE).**
- (74) Anwalt: **MECHNICH, Oliver; BASF Aktiengesellschaft,  
67056 Ludwigshafen (DE).**
- (81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): **AE, AG, AL,  
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,  
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,  
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,  
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,  
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,  
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,  
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,  
ZW.**
- (84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): **ARIPO (BW,  
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,  
ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,  
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT,  
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,  
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).**
- Veröffentlicht:  
— mit internationalem Recherchenbericht

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title:  **$\Delta$ -4 DESATURASES FROM EUGLENA GRACILIS, EXPRESSING PLANTS, AND OILS CONTAINING PUFA**

(54) Bezeichnung:  **$\Delta$ -4-DESATURASEN AUS EUGLENA GRACILIS, EXPRIMIERENDE PFLANZEN UND PUFA ENTHAL-  
TENDE ÖLE**

(57) Abstract: The invention relates to an improved method for the specific production of unsaturated  $\omega$ -3 fatty acids and a method for producing triglycerides containing an increased number of unsaturated fatty acids, especially  $\omega$ -3 fatty acids comprising more than three double bonds. Disclosed is the production of a transgenic organism, preferably a transgenic plant, or a transgenic microorganism containing an increased number of fatty acids, oils, or lipids comprising  $\Delta$ -4 double bonds as a result of a  $\Delta$ -4 desaturase being expressed from *Euglena gracilis*. The invention further relates to expression cassettes containing a nucleic acid sequence, a vector, and organisms containing at least one nucleic acid sequence or an expression cassette. Also disclosed are unsaturated fatty acids and triglycerides having an increased fatty acid content and the use thereof. Fatty acids and triglycerides are used in a plurality of application in the food industry, in animal nutrition, cosmetics, and pharmaceuticals and are suitable for many different applications depending on whether free saturated or unsaturated fatty acids or triglycerides having an increased saturated or unsaturated fatty acid content are used.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein verbessertes Verfahren zur spezifischen Herstellung von ungesättigten  $\omega$ -3 Fettsäuren sowie ein Verfahren zur Herstellung von Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren, besonders von  $\omega$ -3 Fettsäuren mit mehr als drei Doppelbindungen. Die Erfindung betrifft die Herstellung eines transgenen Organismus bevorzugt einer transgenen Pflanze oder eines transgenen Mikroorganismus mit erhöhtem Gehalt an Fettsäuren, Ölen oder Lipiden mit  $\Delta$ -4-Doppelbindungen aufgrund der Expression einer  $\Delta$ -4-Desaturase aus *Euglena gracilis*. usserdem betrifft die Erfindung Expressionskassetten enthaltend eine Nukleinsäuresequenz, einen Vektor und Organismen enthaltend mindestens eine Nukleinsäuresequenz bzw. eine Expressionskassette. Ausserdem betrifft die Erfindung ungesättigte Fettsäuren sowie Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren und deren Verwendung. Fettsäuren und Triglyceride haben eine Vielzahl von Anwendungen in der Lebensmittelindustrie, der Tierernährung, der Kosmetik und im Pharmabereich. Je nachdem ob es sich um freie gesättigte oder ungesättigte Fettsäuren oder um Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren handelt, sind sie für die unterschiedlichsten Anwendungen geeignet.

WO 2004/090123 A3



— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen  
Recherchenberichts: 29. Dezember 2004

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
T/EP2004/003628

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N9/02 C12P7/64 A01H1/00 C12N15/00 A01K67/00  
A23D9/00 A23K1/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/090493 A (ABBOTT LAB) 14 November 2002 (2002-11-14) cited in the application the whole document	1-19
X	WO 02/26946 A (BIORIGINAL FOOD & SCIENCE CORP) 4 April 2002 (2002-04-04) cited in the application sequence IDNO.2	1-19
A	PEREIRA SUZETTE L ET AL: "Recent advances in the study of fatty acid desaturases from animals and lower eukaryotes." PROSTAGLANDINS LEUKOTRIENES AND ESSENTIAL FATTY ACIDS, vol. 68, no. 2, February 2003 (2003-02), pages 97-106, XP002298342 ISSN: 0952-3278	

-/--



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- \*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 September 2004

Date of mailing of the international search report

20/10/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Marinoni, J-C

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

T/EP2004/003628

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BARSANTI LAURA ET AL: "Fatty acid content in wild type and WZSL mutant of <i>Euglena gracilis</i> : Effects of carbon source and growth conditions" JOURNAL OF APPLIED PHYCOLOGY, vol. 12, no. 3-5, October 2000 (2000-10), pages 515-520, XP002298343 ISSN: 0921-8971 -----	
A	LOPEZ ALONSO D ET AL: "Plants as 'chemical factories' for the production of polyunsaturated fatty acids" BIOTECHNOLOGY ADVANCES, ELSEVIER PUBLISHING, BARKING, GB, vol. 18, no. 6, October 2000 (2000-10), pages 481-497, XP004218725 ISSN: 0734-9750 -----	
A	WALLIS J G ET AL: "The DELTA8-desaturase of <i>Euglena gracilis</i> : An alternate pathway for synthesis of 20-carbon polyunsaturated fatty acids" ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, NEW YORK, US, US, vol. 365, no. 2, 15 May 1999 (1999-05-15), pages 307-316, XP002291433 ISSN: 0003-9861 -----	
P,X	MEYER ASTRID ET AL: "Biosynthesis of docosahexaenoic acid in <i>Euglena gracilis</i> : Biochemical and molecular evidence for the involvement of a DELTA4-fatty acyl group desaturase." BIOCHEMISTRY, vol. 42, no. 32, 19 August 2003 (2003-08-19), pages 9779-9788, XP002298344 ISSN: 0006-2960 the whole document -----	1-19

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/003628

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 02090493	A	14-11-2002	US 2003082754 A1	01-05-2003
			US 2003134400 A1	17-07-2003
			CA 2446439 A1	14-11-2002
			EP 1401259 A2	31-03-2004
			WO 02090493 A2	14-11-2002
WO 0226946	A	04-04-2002	AU 1844702 A	08-04-2002
			CA 2421267 A1	04-04-2002
			EP 1322752 A2	02-07-2003
			WO 0226946 A2	04-04-2002
			JP 2004516017 T	03-06-2004
			NO 20031405 A	15-05-2003
			US 2002156254 A1	24-10-2002

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/003628

<b>A. KLASSTIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES</b> IPK 7 C12N9/02 C12P7/64 A01H1/00 C12N15/00 A01K67/00 A23D9/00 A23K1/16		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
<b>B. RECHERCHIERTE GEBIETE</b> Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C12N C12P		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
<b>C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN</b>		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 02/090493 A (ABBOTT LAB) 14. November 2002 (2002-11-14) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-19
X	WO 02/26946 A (BIORIGINAL FOOD & SCIENCE CORP) 4. April 2002 (2002-04-04) in der Anmeldung erwähnt Sequenz IDNO.2	1-19
A	PEREIRA SUZETTE L ET AL: "Recent advances in the study of fatty acid desaturases from animals and lower eukaryotes." PROSTAGLANDINS LEUKOTRIENES AND ESSENTIAL FATTY ACIDS, Bd. 68, Nr. 2, Februar 2003 (2003-02), Seiten 97-106, XP002298342 ISSN: 0952-3278	
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche 28. September 2004		Absenddatum des Internationalen Recherchenberichts 20/10/2004
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Marinoni, J-C

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/003628

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie <sup>a</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>BARSANTI LAURA ET AL: "Fatty acid content in wild type and WZSL mutant of Euglena gracilis: Effects of carbon source and growth conditions"</p> <p>JOURNAL OF APPLIED PHYCOLOGY, Bd. 12, Nr. 3-5, Oktober 2000 (2000-10), Seiten 515-520, XP002298343 ISSN: 0921-8971</p> <p>-----</p>	
A	<p>LOPEZ ALONSO D ET AL: "Plants as 'chemical factories' for the production of polyunsaturated fatty acids"</p> <p>BIOTECHNOLOGY ADVANCES, ELSEVIER PUBLISHING, BARKING, GB, Bd. 18, Nr. 6, Oktober 2000 (2000-10), Seiten 481-497, XP004218725 ISSN: 0734-9750</p> <p>-----</p>	
A	<p>WALLIS J G ET AL: "The DELTA8-desaturase of Euglena gracilis: An alternate pathway for synthesis of 20-carbon polyunsaturated fatty acids"</p> <p>ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, NEW YORK, US, US, Bd. 365, Nr. 2, 15. Mai 1999 (1999-05-15), Seiten 307-316, XP002291433 ISSN: 0003-9861</p> <p>-----</p>	
P,X	<p>MEYER ASTRID ET AL: "Biosynthesis of docosahexaenoic acid in Euglena gracilis: Biochemical and molecular evidence for the involvement of a DELTA4-fatty acyl group desaturase."</p> <p>BIOCHEMISTRY, Bd. 42, Nr. 32, 19. August 2003 (2003-08-19), Seiten 9779-9788, XP002298344 ISSN: 0006-2960 das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-19

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/003628

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 02090493	A	14-11-2002	US 2003082754 A1 01-05-2003
			US 2003134400 A1 17-07-2003
			CA 2446439 A1 14-11-2002
			EP 1401259 A2 31-03-2004
			WO 02090493 A2 14-11-2002
WO 0226946	A	04-04-2002	AU 1844702 A 08-04-2002
			CA 2421267 A1 04-04-2002
			EP 1322752 A2 02-07-2003
			WO 0226946 A2 04-04-2002
			JP 2004516017 T 03-06-2004
			NO 20031405 A 15-05-2003
			US 2002156254 A1 24-10-2002